

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 23 APR 2003

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 13 332.8

Anmeldetag: 25. März 2002

Anmelder/Inhaber: BASF Aktiengesellschaft, Ludwigshafen/DE

Bezeichnung: Tryptophanaminotransferase,
Indol-3-pyruvatdecarboxylase und
Indol-3-acetaldehydoxidase als neue Targets für
Herbizide

IPC: C 12 Q, A 01 N

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 3. März 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wehner

Patentansprüche

1. Verwendung von einem oder mehreren Enzymen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Enzymen Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase in einem Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung.

2. Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit herbizider Wirkung umfassend die folgenden Schritte:

a) Inkontaktbringen von einem oder mehreren Enzymen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Enzymen Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase mit einer oder mehreren Testsubstanzen unter Bedingungen, die die Bindung der Testsubstanz(en) an eines der vorstehend genannten Enzyme oder an die Nukleinsäuresequenz, die eines vorstehend genannten Enzyme kodiert, erlauben; und

b) Nachweis, ob die Testsubstanzen die Transkription, Translation oder Expression von mindestens einem der vorstehend genannten Enzyme reduzieren oder blockieren; oder

c) Nachweis, ob die Testsubstanzen die Aktivität von mindestens einem der vorstehend genannten Enzyme reduzieren oder blockieren; oder

d) Nachweis, ob die Testsubstanz an eines der vorstehend genannten Enzyme bindet.

3. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass man die Testverbindung

a) mit einem pflanzlichen Zelllysatz, das mindestens eines der Enzyme Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase enthält, oder

b) mit mindestens einem der Enzyme Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase, die entweder partiell oder vollständig gereinigt sind, versetzt und

2

c) im Anschluß die enzymatische Aktivität von mindestens einem der vorstehend genannten Enzyme im Vergleich zur Aktivität von mindestens einem der vorstehend genannten, nicht mit einer Testverbindung versetzten Enzyme ermittelt, wobei die chemischen Verbindungen selektiert werden, welche die Aktivität von mindestens einem der vorstehend genannten Enzyme reduzieren oder blockieren.

4. Verfahren nach den Ansprüchen 2 bis 3 dadurch gekennzeichnet, dass man als Enzym Tryptophanaminotransferase einsetzt.

5. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man Tryptophan oder ein Derivat des Tryptophans als Substrat einsetzt und die enzymatische Aktivität in Schritt (c) über

a) die Abnahme an L-Tryptophan; oder

b) die Zunahme an Indol-3-pyruvat; oder

c) die Zunahme an Indol-3-acetaldehyd; oder

d) die Zunahme an Indol-3-essigsäure; oder

e) die Zunahme an Indol-3-buttersäure; oder

f) eine Kombination von mindestens zwei der Methoden (a) bis (e)

ermittelt.

6. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man Indol-3-pyruvat oder ein Derivat des Indol-3-pyruvats als Substrat einsetzt und die enzymatische Aktivität in Schritt (c) über

a) die Abnahme an Indol-3-pyruvat; oder

b) die Zunahme an Indol-3-acetaldehyd; oder

c) die Zunahme an Indol-3-essigsäure; oder

d) die Zunahme an Indol-3-buttersäure; oder

e) eine Kombination von mindestens zwei der Methoden (a) bis (d)

ermittelt.

7. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man
Indol-3-acetaldehyd oder ein Derivat des Indol-3-acetaldehyds
als Substrat einsetzt und die enzymatischen Aktivität in
Schritt (c) über

a) die Abnahme an Indol-3-acetaldehyd; oder

b) die Zunahme an Indol-3-essigsäure; oder

c) eine Kombination der Methoden a) und b)

ermittelt.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der enzymatischen Aktivität spektroskopisch erfolgt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass man die Identifizierung der Substanzen in einem High-Throughput-Screening durchgeführt.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die über das Verfahren ausgewählte Verbindung zur Verifizierung der herbiziden Wirkung auf eine Pflanze appliziert wird.

11. Verbindungen mit herbizider oder wachstumsregulatorischer Wirkung identifiziert über eines der Verfahren nach den Ansprüchen 2 bis 10.

12. Verfahren zur Herstellung einer agrochemischen Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet dass man

i. einen Wirkstoff über eines der Verfahren nach den Ansprüchen 2 bis 10 identifiziert, und

ii. diesen Wirkstoff mit für die Formulierung von agrochemischen Zusammensetzungen geeigneten Hilfsmitteln formuliert.

13. Verfahren zur Bekämpfung von unerwünschtem Pflanzenwuchs und/oder zur Regulation des Wachstums von Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß man eine wirksame Menge mindestens einer Verbindung nach Anspruch 11 oder eine agrochemische Zusammensetzung erhältlich über das in Anspruch 12 genannte Verfahren

4

auf Pflanzen, deren Lebensraum und/oder auf Samen einwirken läßt.

- 5 14. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 11 oder einer agrochemischen Formulierung erhältlich über das in Anspruch 12 genannte Verfahren zur Bekämpfung von unerwünschtem Pflanzenwuchs und/oder zur Regulation des Wachstums von Pflanzen gemäß Anspruch 13.

10

15

20

25

30

35

40

45

Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase als neue Targets für Herbizide

5 Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase als neue Targets für Herbizide, Testverfahren zur Identifizierung herbizid wirkender Inhibitoren von einem oder mehreren der vorstehend genannten Enzyme, die über dieses Verfahren identifizierten Inhibitoren mit herbizider Wirkung, sowie Verfahren zur Bekämpfung unerwünschten Pflanzenwuchses auf Basis der erfindungsgemäßen Inhibitoren.

15 Zum Auffinden neuer Herbizide werden die potentiellen Wirkstoffe nach konventioneller Vorgehensweise auf geeignete Testpflanzen appliziert. Diese Methode weist den Nachteil auf, dass zum Testen relativ große Substanzmengen erforderlich sind. Zum anderen werden bei der direkten Applikation auf die zu testenden Pflanzen bereits im ersten Screeningschritt äußerst hohe Anforderungen an die Testsubstanz gestellt, da nicht nur die Inhibierung oder sonstige Modulation der Aktivität eines zellulären Targets (in der Regel ein Protein oder Enzym als Wirkort für ein Herbizid) erforderlich sind, sondern die Substanz dieses Target zunächst überhaupt erreichen muss. Bereits in diesem ersten Schritt muß die Testsubstanz in Bezug auf Aufnahme durch die Pflanze, Permeabilität durch die verschiedenen Zellwände und Membranen, Persistenz zur Erreichung des gewünschten Effektes hohe Anforderungen erfüllen, ehe es schließlich Inhibierung/ Veränderung der Aktivität des gewünschten Zielenzyms kommen kann.

Es ist angesichts dieser Erfordernisse daher nicht überraschend, dass zum einen die Identifizierung neuer Wirkstoffe immer höhere Kosten verursacht, zum anderen immer weniger Wirkstoffe entdeckt werden.

Es war deshalb Aufgabe in der vorliegenden Erfindung, neue Targets für Herbizide zur Verfügung zu stellen.

40 Diese Aufgabe wurde gelöst durch die Bereitstellung von Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase als neue Targets für Herbizide. In diesem Rahmen wurden weiterhin Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit herbizider Wirkung bereitgestellt, welche auf der Verwendung von einem oder mehreren Enzymen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Enzymen Tryptophanaminotransferase, In-

2

Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase basieren.

Die Biosynthese von Indol-3-essigsäure (Auxin), einem wichtigen Pflanzenhormon, geht von L-Tryptophan aus. In allen höheren Pflanzenspezies wird der vom L-Tryptophan ausgehende Syntheseweg wie folgt realisiert: L-Tryptophan wird über die Tryptophan-Aminotransferase in Indol-3-pyruvat umgewandelt, welches über die Indol-3-pyruvat Decarboxylase in Indol-3-acetaldehyd umgewandelt wird. Im Anschluß katalysiert die Indol-3-acetaldehydoxidase die Umwandlung des Indol-3-acetaldehyds in Indol-3-essigsäure, die wiederum durch die Indol-3-buttersäuresynthase in Indol-3-buttersäure umgewandelt wird. . Dabei liegen die Enzyme Tryptophan-Aminotransferase, Indol-3-pyruvat Decarboxylase und Indol-3-acetaldehyd Oxidase in der Regel in einem Multienzymkomplex vor. (Bartel, B. (1997), Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 51 - 66; Müller, A., Weiler, E.W., (2000), Planta 211, 855 - 863). In Abhängigkeit vom untersuchten Gewebe und Spezies sind aber auch andere untergeordnete Biosynthesewege beschrieben (; Normanly, J., Bartel, B. (1999), Current Opinion in Plant Biology 2, 207 - 213).

Die Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit herbizider Wirkung umfassen die folgenden Schritte:

25

- a) Inkontaktbringen von einem oder mehreren Enzymen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Enzymen Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase mit einer oder mehreren Testsubstanzen unter Bedingungen, die die Bindung der Testsubstanz(en) an eines der vorstehend genannten Enzyme oder an die Nukleinsäuresequenz, die eines vorstehend genannten Enzyme kodiert, erlauben; und
- b) Nachweis, ob die Testsubstanzen die Transkription, Translation oder Expression von mindestens einem der vorstehend genannten Enzyme reduzieren oder blockieren; oder
- c) Nachweis, ob die Testsubstanzen die Aktivität von mindestens einem der vorstehend genannten Enzyme reduzieren oder blockieren; oder
- d) Nachweis, ob die Testsubstanz an eines der vorstehend genannten Enzyme bindet.

Unter Reduktion oder Blockade der Transkription, Expression, Translation oder der Aktivität in Schritt b) und c) ist eine signifikante Abnahme im Vergleich zur Transkription, Expression,

Translation oder der Aktivität bestimmt in Vergleich einem Verfahren, welches sich vom vorstehend genannten Verfahren dadurch unterscheidet, daß man keine Testsubstanz hinzufügt.

5 Unter einer signifikanten Abnahme ist eine Abnahme von mindestens 10 %, vorteilhaft mindestens 20 %, bevorzugt mindestens 30 %, besonders bevorzugt um mindestens 50 % und ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % bis zu 100 % zu verstehen.

10 Der Nachweis gemäß Schritt b) des oben stehenden Verfahrens kann anhand von dem Fachmann bekannten Blotting Methoden erfolgen.

Der Nachweis gemäß Schritt d) des oben stehenden Verfahrens kann anhand von Techniken, welche die Wechselwirkung zwischen Protein

15 und Ligand aufzeigen, detektieren, erfolgen. Hierbei sind insbesondere fünf bevorzugte Ausführungsformen zu nennen, die in Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung auch für Hochdurchsatzmethoden (High Trough Put Screening, HTS) geeignet sind:

20 1. Über Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie (FCS) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 11753-11575) läßt sich die durchschnittliche Diffusionsrate eines Fluoreszenzmoleküls in Abhängigkeit zur Masse in einem kleinen Probenvolumen bestimmen. Durch Messen der Massenänderung bzw. der daraus resultierenden veränderten Diffusionsrate einer Testverbindung
25 beim Binden an das Enzym läßt sich FCS zur Bestimmung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen einsetzen. Ein Testsystem kann direkt zur Messung der Bindung einer durch ein Fluoreszenzmolekül markierten Testverbindung aufgebaut werden. Alternativ kann das Testsystem so konzipiert sein, dass eine
30 durch ein Fluoreszenzmolekül markierte chemische Referenzverbindung durch weitere Testverbindungen verdrängt wird ("Verdrängungsassay"). Die so identifizierten, an das Enzym bindenden Verbindungen sind als Inhibitoren geeignet.

35 2. Die Fluoreszenzpolarisation nutzt die Eigenschaft eines mit polarisiertem Licht angeregten ruhenden Fluorophors ebenfalls wieder polarisiertes Licht zu emittieren. Kann der Fluorophor allerdings während des angeregten Zustands rotieren, so geht
40 die Polarisation des emittierten Fluoreszenzlichts mehr oder weniger verloren. Bei sonst gleichen Bedingungen (z.B. Temperatur, Viskosität, Lösungsmittel) ist die Rotation eine Funktion der Molekülgröße, womit man über das Messsignal eine Aussage über die Größe des am Fluorophor gebundenen Rests
45 treffen kann (Methods in Enzymology 246 (1995), pp. 283-300). Ein Testsystem kann direkt zur Messung der Bindung einer durch ein Fluoreszenzmolekül markierten Testverbindung an das

Enzym aufgebaut werden. Alternativ kann das Testsystem auch in Form des unter 1 beschriebenen "Verdrängungsassays" konzipiert sein. Die so identifizierten, an das Enzym bindenden Verbindungen sind als Inhibitoren geeignet.

3. Fluoreszenz-Resonanz Energie Transfer" (FRET) basiert auf der strahlungslosen Energieübertragung zwischen zwei räumlich benachbarten Fluoreszenzmolekülen unter geeigneten Bedingungen. Eine Voraussetzung ist die Überlappung des Emissionsspektrums des Donormoleküls mit dem Anregungsspektrum des Akzeptormoleküls. Durch Fluoreszenzmarkierung des Enzyms und den auf Bindung Testverbindungen kann mittels FRET die Bindung gemessen werden (Cytometry 34, 1998, pp. 159-179). Alternativ kann das Testsystem auch in Form des unter 1 beschriebenen "Verdrängungsassays" konzipiert sein. Eine besonders geeignete Ausführungsform der FRET Technologie ist die "Homogenous Time Resolved Fluorescence" (HTRF), wie sie von Packard BioScience vertrieben wird. Die so identifizierten, an das Enzym bindenden Verbindungen sind als Inhibitoren geeignet.

4. Surface Enhanced-Laser Desorption/Ionisation (SELDI) in Kombination mit einem Time of Flight Massenspektrometer (MALDI-TOF) ermöglicht die schnelle Analyse von Molekülen auf einem Träger und kann zur Analyse von Protein-Ligand Wechselwirkungen verwendet werden (Worral et al., (1998) Anal. Biochem. 70:750-756). In einer bevorzugten Ausführungsform immobilisiert man nun das Enzym auf einem geeigneten Träger und inkubiert diesen mit der Testverbindung. Nach einem oder mehreren geeigneten Waschschritten kann die an das Enzym zusätzlich gebundenen Moleküle der Testverbindung mittels der oben erwähnten Methodik detektieren und somit Inhibitoren selektieren. Die so identifizierten, an das Enzym bindenden Verbindungen sind als Inhibitoren geeignet.

5. Die Messung von Oberflächen Plasmonenresonanz basiert auf der Änderung des Brechungsindex an einer Oberfläche beim Binden einer Testverbindung an ein auf besagter Oberfläche immobilisiertes Protein. Da die Änderung des Brechungsindex für eine definierte Änderung der Massenkonzentration an der Oberfläche quasi für alle Proteine und Polypeptide identisch ist, kann diese Methode prinzipiell auf jedes Protein angewendet werden (Lindberg et al. Sensor Actuators 4 (1983) 299-304; Malmquist Nature 361 (1993) 186-187). Die Messung kann beispielsweise mit Hilfe der von Biacore (Freiburg) vertriebenen auf Oberflächen-Plasmonenresonanz basierenden Analyseautomaten in einem Durchsatz von derzeit bis zu 384 Proben pro Tag durchgeführt werden. Ein Testsystem kann direkt

5

zur Messung der Bindung einer Testverbindung an das erf.-Protein aufgebaut werden. Alternativ kann das Testsystem auch in Form des unter 1 beschriebenen "Verdrängungsassays" konzipiert sein. Die so identifizierten an das Enzym bindenden Verbindungen sind als Inhibitoren geeignet.

Sämtliche, über die oben genannten Verfahren identifizierten Substanzen können anschließend in einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahren auf ihre herbizide Wirkung überprüft werden.

Eine bevorzugte Ausführungsform des Nachweises gemäß Schritt d) ist dadurch gekennzeichnet, dass man die zu testende Verbindung

- a) mit einem pflanzlichen Zelllysate, das mindestens eines der Enzyme Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase enthält, oder
- b) mit mindestens einem der Enzyme Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase, die entweder partiell oder vollständig gereinigt sind, versetzt und
- c) im Anschluß die enzymatische Aktivität von mindestens einem der vorstehend genannten Enzyme im Vergleich zur Aktivität von mindestens einem der vorstehend genannten Enzyme, die nicht mit einer Testverbindung versetzt wurden, ermittelt, wobei die Verbindungen selektiert werden, welche die enzymatische Aktivität von mindestens einem der vorstehend genannten Enzyme reduzieren oder blockieren.

Die in Schritt (b) eingesetzte, partiell oder vollständig gereinigten Enzyme können aus pflanzlichen Zellen nach dem Fachmann bekannten Prozeduren erhalten werden, wie z.B. in Truelsen, T.A. (Physiol. Plant. 28 (1973) 67 - 70) beschrieben. Hierbei können sämtliche Pflanzenspezies, welche die Auxinbiosynthese über den Eingangs beschriebenen Stoffwechselweg realisieren, zur Isolation der Enzyme herangezogen werden. Beispielhaft, aber nicht abschließend seien hier genannt Vertreter aus der Familie der Leguminosae (Fabaceae) wie Mungbohnen (*Vigna radiata*), Bohne (*Phaseolus vulgaris*) oder Erbse (*Pisum sativum*) sowie Vertreter aus der Familie der Gramineae (Poaceae) wie Mais (*Zea mays*). Weitere Vertreter aus der Familie der Leguminosae sind dem Fachmann bekannt und beispielsweise in Strasburger "Lehrbuch der Botanik", Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F., Bresinsky, A., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart beschrieben.

6

Zur Identifizierung von Verbindungen in Schritt (c) wird nach einer Reaktionszeit die enzymatische Aktivität des entsprechenden Enzyms im Vergleich zur Aktivität der nicht gehemmten Enzyms ermittelt. Hierbei werden Verbindungen selektiert, die eine signifikante Abnahme der enzymatischen Aktivität zur Folge haben.

Unter Reaktionszeit ist hier die Zeit zu verstehen, die man für die Durchführung eines Aktivitätstests bis zum Erhalt einer signifikanten Aussage über eine Aktivität benötigt. Sie hängt sowohl von der spezifischen Aktivität des im Test eingesetzten Proteins als auch von der verwendeten Methode und der Empfindlichkeit der verwendeten Geräte ab. Dem Fachmann ist die Ermittlung der Reaktionszeiten bekannt. Bei auf spektroskopischen Methoden basierenden Testsystemen liegen die Reaktionszeiten im allgemeinen zwischen > 0 bis 120 Minuten.

Die Bestimmung der Aktivität kann durch Inkubation des jeweiligen Enzyms mit einem geeigneten Substrat erfolgen, wobei der Umsatz des Substrates oder der Anstieg des entstehenden Produktes spektroskopisch verfolgt wird.

Beispielsweise können Tryptophan, Indol-3-pyruvat und Indol-3-acetaldehyd als Substrate eingesetzt werden. Daneben können auch radioaktive Derivate oder mit chromophoren oder fluorophoren Gruppen modifizierte Derivate des Tryptophan, Indol-3-pyruvat und Indol-3-acetaldehyd in den Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden, die zum Beispiel eine spektroskopische Bestimmung ermöglichen.

In Abhängigkeit vom eingesetzten Substrat ergeben sich prinzipiell drei Verfahrensvarianten für die Bestimmung der Enzymatischen Aktivität:

Verfahrensvariante 1 a)-e):

35

Verwendet man Tryptophan als Substrat zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von mindestens einem der Enzyme ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Enzymen Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase in Schritt (c) des Verfahrens I, so kann die enzymatische Aktivität über

- a) die Abnahme an L-Tryptophan; oder
- 45 b) die Zunahme an Indol-3-pyruvat; oder

7

- c) die Zunahme an Indol-3-acetaldehyd; oder
- d) die Zunahme an Indol-3-essigsäure; oder
- 5 e) eine Kombination von mindestens zwei der Methoden (a) bis (d)

ermittelt werden.

10 Verfahrensvariante 2 a)-d):

Verwendet man Indol-3-pyruvat als Substrat zur Bestimmung zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von einem oder beiden Enzymen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Enzymen In-

- 15 dol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase in Schritt (c) des Verfahrens I, so kann die enzymatische Aktivität über

- a) die Abnahme an Indol-3-pyruvat; oder
 - 20 b) die Zunahme an Indol-3-acetaldehyd; oder
 - c) die Zunahme an Indol-3-essigsäure; oder
 - 25 d) eine Kombination von mindestens zwei der Methoden (a) bis (c)
- ermittelt werden.

Verfahrensvariante 3 a)-c):

- 30 Verwendet man Indol-3-acetaldehyd als Substrat zur Bestimmung zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Indol-3-acetaldehydoxidase in Schritt (c) des Verfahrens I, so kann die enzymatische Aktivität über

- 35 a) die Abnahme an Indol-3-acetaldehyd; oder
 - b) die Zunahme an Indol-3-essigsäure; oder
 - 40 c) eine Kombination der Methoden (a) und (b)
- ermittelt werden.

- Hierbei richtet sich die Wahl der Verfahrensvariante aber auch
- 45 die in den jeweiligen Verfahrensvarianten erwähnten Methodenkombinationen nach der Zusammensetzung der für den Test eingesetzten

8

Enzymlösung bzw. danach, welche enzymatische Aktivität zu bestimmen ist.

Enthält die für die den Test eingesetzte Enzymlösung die Enzyme
5 Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase so sind folgende Methoden möglich: 1 a), 1 d), 1 e) ($e=a+d$), 2 a), 2 c), 2 d) ($d=a+c$) und 3 a), 3 b), 3 c) ($c=a+b$).

10 Enthält die für die den Test eingesetzte Enzymlösung Tryptophanaminotransferase und Indol-3-pyruvatdecarboxylase so sind folgende Methoden möglich: 1 a), 1 c), 1 e) ($e=a+c$), 2 a), 2 b), 2 d) ($d=a+b$)

15 Enthält die für die den Test eingesetzte Enzymlösung Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase so sind folgende Methoden möglich: 2 a), 2 c), 2 d) ($d=a+c$) und 3 a), 3 b), 3 c) ($c=a+b$).

20 Enthält die für die den Test eingesetzte Enzymlösung Tryptophanaminotransferase so sind folgende Methoden möglich: 1 a), 1 b), 1 e) ($e=a+b$).

Enthält die für die den Test eingesetzte Enzymlösung Indol-3-pyruvatdecarboxylase so sind folgende Methoden möglich: 2 a), 2 b), 2 d) ($d=a+b$)

Enthält die für die den Test eingesetzte Enzymlösung Indol-3-acetaldehydoxidase so sind folgende Methoden möglich: 3 a), 3 b), 3 c) ($c=a+b$).

30 In einer bevorzugten Ausführungsform der oben genannten Verfahrensvarianten wird zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität eine Mischung aus den drei Enzymen Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase verwendet, was wie oben stehend erwähnt folgende Testmethoden ermöglicht: 1 a), 1 d), 1 e) ($e=a+d$), 2 a), 2 c), 2 d) ($d=a+c$) und 3 a), 3 b), 3 c) ($c=a+b$).

40 Geeignete spektroskopische Methoden für die genannten Verfahren 1, 2 und 3 sind Massenspektroskopie oder UV-VIS Spektroskopie, LC/UV-VIS (Flüssigchromatographie/UV-Vis Spektroskopie) oder UV-Vis Spektroskopie). Insbesondere für die jeweiligen Verfahrensvarianten 1b), 1d), 1 e), 2 d) und 3 c) eignet sich Massenspektroskopie wie LC/MS oder HPLC/MS oder diverse auf LC oder HPLC basierende
45 Methoden in Verbindung mit Leitfähigkeitsmessungen, NMR-Messungen

oder Messungen des Brechungsindex, da diese die zeitgleiche Bestimmung unterschiedlicher Substanzen ermöglicht.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die photometrische Bestimmung angelehnt an ein von Simpson, R.M. et al. (Planta 201 (1997) 71 - 77) und Truelsen, T.A. et al. (Phsiol. Plant. (1972) 26, 289 - 295) beschriebenes Verfahren, die massenspektroskopische Bestimmung angelehnt an ein von Simpson, R.M. et al. (Planta 201 (1997), 71 - 77) beschriebenes Verfahren.

10

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Zu- bzw. Abnahme von Tryptophan und/oder Indol-3-pyruvat und/oder die Zunahme von Indol-3-essigsäure und/oder Indol-3-buttersäure zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität photometrisch ermittelt.

15

Die photometrische Bestimmung kann beispielsweise durch die Zu- bzw. Abnahme an Indol-3-pyruvat bei der Wellenlänge $\lambda = 328\text{nm}$ detektiert werden (Simpson, R.M., Nonhebel, H.M., Christie, D.L. (1997), Planta 201, 71 - 77, Truelsen, T.A. (1972), Phsiol.

20 Plant., 26, 289 - 295).

Die Zu- oder Abnahme an Indol-3-essigsäure kann mittels Fluoreszenz detektiert werden ($\text{Ex} = 254\text{nm}$; $\text{Em} = 360\text{nm}$; nach Mazur H. et al, J. Appl. Phycology 13 (2001) 35-42).

25

Zudem können sämtliche, in den vorstehend genannten Verfahren identifizierten Inhibitoren der Enzyme in einem in vivo Aktivitätstest auf ihre herbizide Wirkung überprüft werden. Hierbei wird die entsprechende Substanz zur Überprüfung der herbiziden

30 Wirkung auf die entsprechende Schadpflanze appliziert.

Alle oben beschriebenen Verfahren werden im folgenden mit dem Begriff "erfindungsgemäßes Verfahren" beschrieben.

35 Das erfindungsgemäße Verfahren kann in einzelnen getrennten Verfahrensansätzen und/oder vorteilhaft gemeinsam oder besonders vorteilhaft in einem High-Throughput-Screening durchgeführt werden und zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung verwendet werden.

40

In dem erfindungsgemäßen Verfahren können auch mehrere Testverbindungen eingesetzt werden. Wenn durch eine Gruppe von Testverbindungen eine Beeinflussung des Targets erfolgt, dann ist es entweder möglich, die einzelnen Testverbindungen direkt zu isolieren oder die Gruppe von Testverbindungen in verschiedene Untergruppen teilen, z.B. wenn sie aus einer Vielzahl von verschiedenen Komponenten besteht, um so die Zahl der verschiedenen Test-

10

verbindungen im Testsystem zu reduzieren. Das erfindungsgemäße Verfahren wiederholt man dann mit der einzelnen Testverbindung oder der entsprechenden Untergruppe von Testverbindungen. Abhängig von der Komplexität der Probe können die oben beschriebenen Schritte mehrmals wiederholt werden, vorzugsweise bis die gemäß der erfindungsgemäßen Methode identifizierte Untergruppe nur noch eine geringe Anzahl von Testverbindungen oder nur noch eine Testverbindung umfaßt.

- 10 Weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen identifiziert nach den erfindungsgemäßen Verfahren. Diese Verbindungen werden im folgenden "selektierte Verbindungen" genannt. Sie weisen ein Molekulargewicht von kleiner 1000 g/mol, vorteilhaft kleiner 900 g/mol, bevorzugt kleiner 800 g/mol, besonders bevorzugt kleiner 700 g/mol, ganz besonders bevorzugt kleiner 600 g/mol und einem Ki-Wert kleiner 1 mM auf.

Die über die erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Verbindungen können natürlich auch in Form ihrer landwirtschaftlich brauchbaren Salze vorliegen.

Unter landwirtschaftlich brauchbaren Salzen kommen vor allem die Salze derjenigen Kationen oder die Säureadditionssalze derjenigen Säuren in Betracht, deren Kationen beziehungsweise Anionen die herbizide Wirkung der über die erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Verbindungen mit herbizider Wirkung nicht negativ beeinträchtigen.

Ferner können die selektierte Verbindungen sofern sie asymmetrisch substituierte α -Kohlenstoffatome enthalten, entweder als Racemate, Enantiomerengemische, reine Enantiomere oder, sofern sie chirale Substituenten aufweisen, auch als Diastereomerengemische vorliegen.

Die selektierten Verbindungen können chemisch synthetisierte oder mikrobiologisch produzierte Stoffe sein und z.B. in Zellextrakten von z.B. Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen auftreten. Das Reaktionsgemisch kann ein zellfreier Extrakt sein oder eine Zelle oder Zellkultur umfassen. Geeignete Methoden sind dem Fachmann bekannt und werden z.B. allgemein beschrieben in Alberts, Molecular Biology the cell, 3rd Edition (1994), z.B. Kapitel 17.

Mögliche Testverbindungen können Expressionsbibliotheken wie z.B. cDNA-Expressionsbibliotheken, Peptide, Proteine, Nukleinsäuren, Antikörper, kleine organische Stoffe, Hormone, PNAs oder ähnliches sein (Milner, Nature Medicine 1 (1995), 879-880; Hupp, Cell.

83 (1995), 237-245; Gibbs, Cell. 79 (1994), 193-198 und darin zitierte Referenzen).

Die selektierte Verbindungen können zur Bekämpfung von unerwünschtem Pflanzenwuchs sowie unter Umständen auch zur Defoliation, beispielsweise von Kartoffeln, oder Desikkation, beispielsweise von Baumwolle verwendet werden. Des weiteren können die selektierten Verbindungen ggf. auch zur Regualtion des Wachstums von Pflanzen verwendet werden, da Inhibitoren der Biosynthese des Pflanzenhormons Auxins einen Einfluß auf das Wachstum der Pflanzen haben können. Agrochemische Zusammensetzungen, welche die selektierten Verbindungen enthalten, bekämpfen Pflanzenwuchs auf Nichtkulturflächen sehr gut, besonders bei hohen Aufwandmengen. In Kulturen wie Weizen, Reis, Mais, Soja und Baumwolle wirken sie gegen Unkräuter und Schadgräser, ohne die Kulturpflanzen nennenswert zu schädigen. Dieser Effekt tritt vor allem bei niedrigen Aufwandmengen auf. Die selektierten Verbindungen können zur Bekämpfung der oben bereits erwähnten Schadpflanzen verwendet werden.

In Abhängigkeit von der jeweiligen Applikationsmethode können selektierten Verbindungen bzw. diese enthaltende agrochemische Zusammensetzungen vorteilhaft noch in einer weiteren Zahl von Kulturpflanzen zur Beseitigung unerwünschter Pflanzen eingesetzt werden. In Betracht kommen beispielsweise folgende Kulturen:

Allium cepa, Ananas comosus, Arachis hypogaea, Asparagus officinalis, Beta vulgaris spec. altissima, Beta vulgaris spec. rapa, Brassica napus var. napus, Brassica napus var. napobrassica, Brassica rapa var. silvestris, Camellia sinensis, Carthamus tinctorius, Carya illinoensis, Citrus limon, Citrus sinensis, Coffea arabica (Coffea canephora, Coffea liberica), Cucumis sativus, Cynodon dactylon, Daucus carota, Elaeis guineensis, Fragaria vesca, Glycine max, Gossypium hirsutum, (Gossypium arboreum, Gossypium herbaceum, Gossypium vitifolium), Helianthus annuus, Hevea brasiliensis, Hordeum vulgare, Humulus lupulus, Ipomoea batatas, Juglans regia, Lens culinaris, Linum usitatissimum, Lycopersicon lycopersicum, Malus spec., Manihot esculenta, Medicago sativa, Musa spec., Nicotiana tabacum (N.rustica), Olea europaea, Oryza sativa, Phaseolus lunatus, Phaseolus vulgaris, Picea abies, Pinus spec., Pisum sativum, Prunus avium, Prunus persica, Pyrus communis, Ribes sylestre, Ricinus communis, Saccharum officinarum, Secale cereale, Solanum tuberosum, Sorghum bicolor (s. vulgare), Theobroma cacao, Tri-
folium pratense, Triticum aestivum, Triticum durum, Vicia faba, Vitis vinifera, Zea mays.

12

Darüber hinaus können die selektierten Verbindungen auch in Kulturen, die durch Züchtung einschließlich gentechnischer Methoden gegen die Wirkung von Herbiziden tolerant sind, verwandt werden.

- 5 Weiter Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der oben bereits erwähnten agrochemischen Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet dass man selektierten Verbindungen mit für die Formulierung geeigneten Hilfsmitteln formuliert.
- 10 Die selektierten Verbindungen können z.B. in Form von direkt versprühbaren wässrigen Lösungen, Pulvern, Suspensionen, auch hochprozentigen wässrigen, öligen oder sonstigen Suspensionen bzw. Suspoemulsionen oder Dispersionen, emulgierbaren Konzentraten, Emulsionen, Öldispersionen, Pasten, Stäubemitteln, Streumitteln
- 15 oder Granulaten formuliert werden und durch Versprühen, Vernebeln, Verstäuben, Verstreuen oder Gießen angewendet werden. Die Anwendungsformen richten sich nach den Verwendungszwecken und der Natur der selektierten Verbindungen und sollten in jedem Fall möglichst die feinste Verteilung der selektierten Verbindungen
- 20 gewährleisten. Die agrochemischen Zusammensetzung enthalten eine herbizid wirksame Menge mindestens einer selektierten Verbindung und für die Formulierung von agrochemischen Zusammensetzungen übliche Hilfsstoffe.
- 25 Zur Herstellung von Emulsionen, Pasten oder wässrigen oder ölhaltigen Formulierungen sowie dispergierbaren Konzentraten (DC) können die selektierten Verbindungen in einem Öl oder Lösungsmittel gelöst oder dispergiert werden, wobei weitere Formulierungshilfsstoffe zur Homogenisierung zugesetzt werden können. Es
- 30 können aber auch aus selektierter Verbindung, gegebenenfalls Lösungsmitteln oder Öl sowie optional weiteren Hilfsmitteln bestehende flüssige oder feste Konzentrate hergestellt werden, die zur Verdünnung mit Wasser geeignet sind. Hier zu nennen sind emulgierbare Konzentrate (EC, EW), Suspensionen (SC), lösliche Kon-
- 35 zentrate (SL), dispergierbaren Konzentrate (DC), Pasten, Pastillen netzbaren Pulvern oder Granulaten, wobei die festen Formulierungen entweder in Wasser löslich (soluble) oder dispergierbar (wetable) sein können. Desweiteren können entsprechende Pulver bzw. Granulate oder Tabletten noch mit einem festen, den Abrieb
- 40 oder eine vorzeitige Wirkstofffreisetzung verhinderenden Überzug ("coating") versehen werden.

Prinzipiell sind unter dem Begriff Hilfsmittel folgende Substanzklassen zu verstehen: Antischäumungsmittel, Verdicker, Netz-,
45 Haftmittel, Dispergiermittel, Emulgiermittel, Bakterizide und/

oder thixotrophe Agentien. Die Bedeutung der oben genannten Mittel ist dem Fachmann bekannt.

- SLs, EWS und ECs können durch einfaches Mischen der entsprechenden Inhaltsstoffe hergestellt werden, Pulver über Mischen oder Vermahlen in speziellen Mühlentypen (z.Bsp. Hammermühlen). DC, SCs und SEs werden üblicherweise über Naßvermahlung ("wet milling") hergestellt, wobei ein SE aus einem SC durch Zugabe einer organischen Phase, die weitere Hilfsmittel oder selektierte Verbindungen enthalten kann, hergestellt werden kann. Die Herstellung ist bekannt. Pulver-, Streu- und Stäubemittel können vor- teilhaft durch Mischen oder gemeinsames Vermahlen der wirksamen Substanzen mit einem festen Trägerstoff hergestellt werden. Granulate, z.B. Umhüllungs-, Imprägnierungs- und Homogengranulate können durch Bindung der selektierten Verbindungen an feste Trägerstoffe hergestellt werden. Weitere Details der Herstellung sind dem Fachmann bekannt, und z.Bsp. in folgenden Schriften aufgeführt: US 3,060,084, EP-A 707445 (für flüssige Konzentrate), Browning, "Agglomeration", Chemical Engineering, Dec. 4, 1967, 147-48, Perry's Chemical Engineer's Handbook, 4th Ed., McGraw-Hill, New York, 1963, pages 8-57 und ff. WO 91/13546, US 4,172,714, US 4,144,050, US 3,920,442, US 5,180,587, US 5,232,701, US 5,208,030, GB 2,095,558, US 3,299,566, Klingman, Weed Control as a Science, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1961, Hance et al., Weed Control Handbook, 8th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1989 und Mollet, H., Grubemann, A., Formulation technology, Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim (Federal Republic of Germany), 2001.
- Inerte flüssige und/oder feste Trägerstoffe geeignet für die erfindungsgemäßen Formulierungen sind dem Fachman in einer Vielzahl bekannt, wie z.Bsp. flüssige Zusatzstoffe wie Mineralölfraktionen von mittlerem bis hohem Siedepunkt, wie Kerosin oder Dieselöl, ferner Kohlenteeröle sowie Öle pflanzlichen oder tierischen Ursprungs, aliphatische, cyclische und aromatische Kohlenwasserstoffe, z.B. Paraffin, Tetrahydronaphthalin, alkylierte Naphthaline oder deren Derivate, alkylierte Benzole oder deren Derivate, Alkohole wie Methanol, Ethanol, Propanol, Butanol, Cyclohexanol, Ketone wie Cyclohexanon oder stark polare Lösungsmittel, z.B. Amine wie N-Methylpyrrolidon oder Wasser.

Feste Trägerstoffe sind beispielsweise Mineralerden wie Kieselsäuren, Kieselgele, Silikate, Talkum, Kaolin, Kalkstein, Kalk, Kreide, Bolus, Löß, Ton, Dolomit, Diatomeenerde, Calcium- und Magnesiumsulfat, Magnesiumoxid, gemahlene Kunststoffe, Düngemittel, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumphosphat, Ammoniumnitrat, Harnstoffe

14

und pflanzliche Produkte wie Getreidemehl, Baumrinden-, Holz- und Nußschalenmehl, Cellulosepulver oder andere feste Trägerstoffe.

Oberflächenaktive Stoffe (Tenside) geeignet für die erfindungsge-
5 mäßigen Formulierungen sind dem Fachman in einer Vielzahl bekannt,
wie z.Bsp. Alkali-, Erdalkali-, Ammoniumsalze von aromatischen
Sulfonsäuren, z.B. Lignin-, Phenol-, Naphthalin- und Dibutylnaph-
thalinsulfonsäure, sowie von Fettsäuren, Alkyl- und Alkylarylsul-
fonaten, Alkyl-, Laurylether- und Fettalkoholsulfaten, sowie
10 Salze sulfatierter Hexa-, Hepta- und Octadecanolen sowie von Fet-
talkoholglykoether, Kondensationsprodukte von sulfoniertem Naph-
thalin und seiner Derivate mit Formaldehyd, Kondensationsprodukte
des Naphthalins bzw. der Naphthalinsulfonsäuren mit Phenol und
Formaldehyd, Polyoxyethylenoctylphenolether, ethoxyliertes Isooc-
15 tyl-, Octyl- oder Nonylphenol, Alkylphenyl-, Tributylphenylpolyg-
lykoether, Alkylarylpolyetheralkohole, Isotridecylalkohol, Fet-
talkoholethylenoxid-Kondensate, ethoxyliertes Rizinusöl, Poly-
oxyethylenalkylether oder Polyoxypropylenalkylether, Laurylalko-
holpolyglykoetheracetat, Sorbitester, Lignin-Sulfitablaugen oder
20 Methylcellulose.

Die Applikation der agrochemischen Zusammensetzungen bzw. der
selektierten Verbindungen kann im Vorauf- oder im Nachauf-
laufverfahren erfolgen. Sind die selektierten Verbindungen für
25 gewisse Kulturpflanzen weniger verträglich, so können Ausbrin-
gungstechniken angewandt werden, bei welchen die selektierten
Verbindungen mit Hilfe der Spritzgeräte so gespritzt werden, daß
die Blätter der empfindlichen Kulturpflanzen nach Möglichkeit
nicht getroffen werden, während die selektierten Verbindungen auf
30 die Blätter darunter wachsender unerwünschter Pflanzen oder die
unbedeckte Bodenfläche gelangen (post-directed, lay-by).

Die Aufwandmengen an selektierten Verbindungen betragen je nach
Bekämpfungsziel, Jahreszeit, Zielpflanzen und Wachstumsstadium
35 0.001 bis 3.0, vorzugsweise 0.01 bis 1.0 kg/ha.

Die Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter
veranschaulicht, die nicht als beschränkend aufgefaßt werden
sollten.

40

Beispiel 1 - Enzymisolierung der Tryptophanaminotransferase (TA-
Tase) aus etiolierten Mungbohnen (nach Simpson, R.M., Nonhebel,
H.M., Christie, D.L. (1997), Planta 201, 71 - 77)

45

15

Die Mungbohnen (*Vigna radiata*) werden für 6-7 Tage in Vermiculite im Dunkeln angezogen. Die Pflanzen sind zum Erntezeitpunkt ca. 8 cm hoch.

- 5 Sämtliche folgenden Arbeitsschritte finden bei 4°C statt. 100g frisch geerntetes Pflanzenmaterial wird bei 4°C mit 100 ml Extraktionspuffer (50mM KH_2PO_4 , pH 8.5; 0.5mM EDTA; 0.5mM MnCl_2 ; 10mM Isoascorbat) in 2 Schritten von je 1 min mit einem Mixer homogenisiert. Danach wird 5 g Polyvinylpolypyrrolidon zugesetzt (Verhältnis Pflanzenmat./ PVPP 100 : 5), 5 min gerührt, anschließend über 8 lagige Gaze filtriert. Nach Zentrifugation des Filtrates (20000g, 4°C, 20min; SL-250 T Rotor - Sorvall Super T 1 Zentrifuge) wird der Überstand einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung (60%, 80%). Der verbleibende Überstand wird verworfen, das
- 10 Pellet mit 3ml Säulenpuffer (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1M NaCl) resuspendiert und auf ein Gesamtvolumen von 5,0 ml gebracht und über eine äquilibrierte PD 10 Säule (Amersham Pharmacia) entsalzt. Die entsalzte Enzymlösung wird je nach Verwendung portionsweise bei -20°C eingefroren, kann aber je nach Bedarf auch direkt in den Enzymassay eingesetzt werden.
- 20

Beispiel 2 - Enzymassay

- In einem geeigneten Gefäß werden 500µl Assaypuffer (0.1M Borax, pH 8,5; 10mM Tryptophan, 0.5mM Na-Arsenat, 0.5mM EDTA, 50µM Pyridoxalphosphat), 100µl einer frisch angesetzten 10mM α -Ketoglutaratlösung und ca. 50-250µl Enzymlösung (5mg/ml) eingesetzt. Man ergänzt den Assay mit Wasser sowie 10µl Wirkstofflösung ad 1 ml, wobei die zugegebene Menge an Wirkstofflösung zwischen 1-5% des Gesamtansatzvolumens liegen und 1mM nicht überschreiten sollte, und inkubiert 30 Minuten unter Schütteln bei 60°C. Anschließend wird die Reaktion mit 150µl Methanol gestoppt und die Probe bei 20000g / 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird mittels LCMS - Methode analysiert, wobei die folgenden Geräte/Parameter verwendet werden (hier sollte doch die Angabe des Gerätetypes alle weiteren Parameter überflüssig machen):
- 30
- 35

Geräte: Pumpen Bio-Tek 522 und 520
Säulenthermostat Bio-Tek 582
40 Autosampler Bio-Tek 560
UV-Detektor Bio-Tek 535
Massendetektor Applied Biosystems Mariner

Säule: Phenomenex Aqua 3µ C18 125 A, 150 x 2 µm
45 Flußrate: 0,3 ml/min
Laufmittel: Puffer A: 0,2% Essigsäure
Puffer B: Methanol

16

verwendeter Gradient: 0 - 30 min 75% auf 50% linear Puffer A
30 - 35 min 50% Puffer A
35 - 40 min 50% auf 75% linear Puffer A
40 - 45 min 75 % Puffer A

UV-Detektor: 280 nm

10

Die für die Auswertung benötigten Retentionszeiten sind in Tabelle 1 zusammengefaßt:

Tabelle 1

15

Verbindung	Retentionszeiten:
L-Tryptophan	3,8 min
Indol-3-essigsäure	23,7 min
Indol-3-pyruvat	35,2 min 42,5 min *)

20

*) hierbei handelt es sich um Ketoenoltautomerie

25

30

35

40

45

Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase als neue Targets für Herbizide

5 Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase als neue Targets für Herbizide, Testverfahren zur Identifizierung herbizid wirkender Inhibitoren von einem oder mehreren der vorstehend genannten Enzyme, die über dieses Verfahren identifizierten Inhibitoren mit herbizider Wirkung, sowie Verfahren zur Bekämpfung unerwünschten Pflanzenwuchses auf Basis der erfindungsgemäßen Inhibitoren.

15

20

25

30

35

40

45

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.